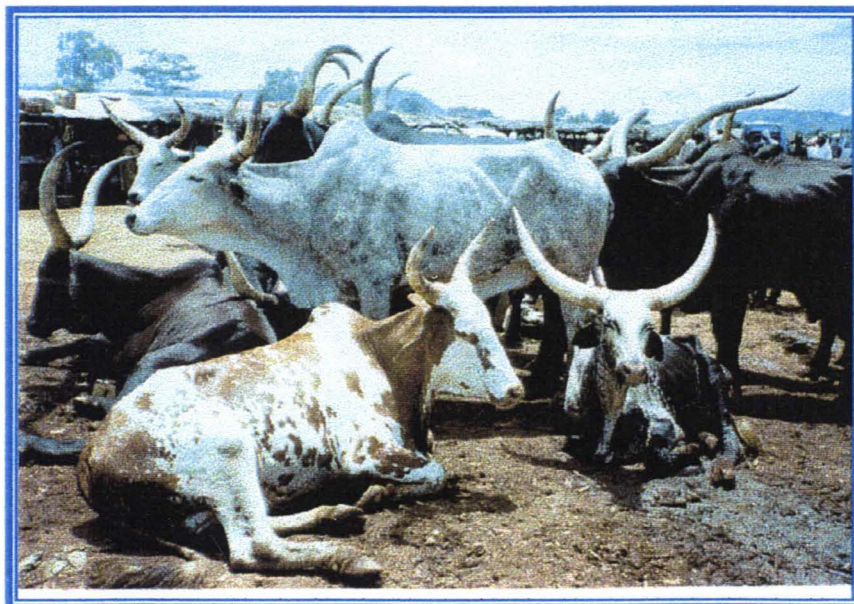




Compte-rendu de la mission d'appui au Laboratoire de Diagnostic de l'Agence Nationale de Développement de l'Elevage

Bangui, du 22 novembre au 3 décembre 1999

« *Projet 7 ACP CA 034 PAR CET 7 ACP RPR 396 PARC* »



Par Genevieve LIBEAU
Et Armelle DAVID

Cirad-Emvt

Rapport n° 02-00

Janvier 2000



CIRAD-EMVT
Département Elevage et Médecine
Vétérinaire du CIRAD
Campus International de Baillarguet
B.P. 5035
Montferrier-sur-Lez
34032 Montpellier Cedex 1

Tous droits de traduction, de reproduction par tous procédés,
De diffusion et de cession réservés pour tous pays

© Cirad-emvt 2000

AUTEUR : Geneviève LIBEAU
Armelle DAVID

ACCES au DOCUMENT :
Service de Documentation du CIRAD

ORGANISME AUTEUR:
CIRAD-EMVT

**ACCES à la REFERENCE DU UNION
DOCUMENT:**
Libre

REFERENCE:
7 ACP RPR 396 PARC

AU PROFIT DE:
Ministère de l'Agriculture et de l'Elevage - République Centrafricaine

TITRE: MISSION D'APPUI AU LABORATOIRE DE DIAGNOSTIC DE BANGUI

TYPE D'APPROCHE DATE et LIEU de PUBLICATION:
Montpellier - Janvier 2000

PAYS ou REGIONS CONCERNES:
République Centrafricaine

MOTS CLEFS:
Republique Centrafricaine, peste bovine, PPCB, PPCC, PPR, PARC-PACE, épidémiosurveillance, vaccination, réseau, formation, alerte précoce-réaction rapide

RESUME

Une mission d'appui définie dans le cadre du projet PARC et relative à l'évaluation des capacités de diagnostic et à la mise en place de techniques ELISA a été menée au Laboratoire de L'ANDE de Bangui du 22 novembre au 3 décembre 1999.

La mission avait pour objectif général la relance du laboratoire par la formation et la sensibilisation du personnel technique, avec comme priorité, l'intégration dans le réseau de sérosurveillance du futur programme PACE. Sur la plan spécifique du diagnostic, la mission avait pour but de former le personnel à la mise en routine des méthodologies adaptées au dépistage sérologique et antigénique des maladies et/ou à l'évaluation de leur prévalence. Le diagnostic de la peste bovine, de la peste des petits ruminants de la péripneumonie contagieuse bovine et de la pleuropneumonie contagieuse caprine, est effectué à l'aide de kits ELISA.

L'inventaire des ressources humaines, a montré que le personnel doit pouvoir bénéficier, pour renforcer son expertise, d'un encadrement technique adéquat, de stages de formation nationaux ou internationaux. Avec la relance du système national de sérosurveillance et l'augmentation du nombre d'échantillons à traiter, le groupe de diagnostic, devrait pouvoir obtenir un poste supplémentaire pour un jeune ayant un BTS.

SOMMAIRE

SYNTHESE	1
CADRE DE LA MISSION	2
1. BILAN	3
1.1 Situation sanitaire.....	3
1.1.1 Peste bovine	3
1.1.2 Peste des Petits Ruminants	4
1.1.3 Maladies pestiformes.....	4
1.1.4 Péripleumonie Contagieuse Bovine.....	4
1.1.5 Pleuropneumonie Contagieuse Caprine	4
1.2 Le Laboratoire Vétérinaire de Bangui	4
1.2.1 Personnel.....	4
1.2.2 Locaux, équipement et matériel.....	5
2. STAGE	6
2.1 Réactifs utilisés	6
2.2 Formation réalisée	8
2.3 Premiers résultats	8
2.3.1 Peste des Petits Ruminants	8
2.3.2 Peste Bovine.....	11
2.3.3 Péripleumonie Contagieuse Bovine.....	11
2.3.4 Pleuropneumonie Contagieuse Caprine	
3. PROPOSITIONS ET RECOMMANDATIONS.....	12
3.1 Le laboratoire.....	12
3.1.1 Laboratoire et réseau de surveillance	12
3.1.2 Besoins en réactifs et consommables pour une année de travail.....	12
3.2 Ressources humaines.....	16
4. CONCLUSION.....	17

Table des Figures

Figure I : Test PCR	9
---------------------------	---

Table des tableaux

Tableau I : Récapitulatif des kits mis en jeu	7
Tableau II : Suspensions légitimes.....	10
Tableau III : Kits de détection d'anticorps	13
Tableau IV : Kits de détection d'antigène	14
Tableau V : Consommables	15

SYNTHESE

Une mission d'appui définie dans le cadre du projet PARC et relative à l'évaluation des capacités de diagnostic et à la mise en place de techniques ELISA a été menée au Laboratoire de L'ANDE de Bangui du 22 novembre au 3 décembre 1999.

La mission avait pour objectif général la relance du laboratoire par la formation et la sensibilisation du personnel technique avec comme priorité l'intégration dans le réseau de sérosurveillance du futur programme PACE. En effet, ce laboratoire représente un maillon essentiel dans ce réseau. La situation particulière de la RCA concernant les risques d'entrée de la Peste Bovine et, d'un point de vue général, la carence importante en données sanitaires, confirment la nécessité d'un appui particulier au laboratoire de Bangui.

L'inventaire des ressources de ce laboratoire montre que l'équipement en gros et petits matériels existe. Un certain nombre de techniques de diagnostic basées principalement sur l'usage de kits ELISA peuvent être mises en routine dans le laboratoire. Les kits existants ont été mis en œuvre et la technicité du personnel mise à l'épreuve, notamment pour le diagnostic de la peste bovine et de la PPR.

Cependant, se pose actuellement la question, pour la sérosurveillance de la peste bovine, du maintien du kit actuel (manque de sensibilité de détection des anticorps dus à la maladie). Les nouveaux kits fournis ont permis de mettre en route le diagnostic de la péripneumonie contagieuse bovine et de la pleuropneumonie contagieuse caprine. L'utilisation de tels kits standardisés, permet une gestion et une interprétation accréditée par les autorités internationales : OIE, FAO, AIEA. Cette formation a été l'occasion, également, de faire le bilan des analyses qui peuvent être actuellement faites et dans l'avenir par le laboratoire de Bangui et d'identifier les besoins en consommables et en réactifs pour une année de travail.

Cependant le défaut de maintenance pour certains appareils, et un budget de fonctionnement réduit, est incompatible avec certaines activités du diagnostic, notamment l'isolement et la conservation des virus et l'accès à la PCR.

L'inventaire des ressources humaines, montre que le personnel doit pouvoir bénéficier, pour renforcer son expertise, d'un encadrement technique adéquat, de stages de formation nationaux ou internationaux. Avec la relance du système national de sérosurveillance et l'augmentation du nombre d'échantillons à traiter, le groupe de diagnostic, devrait pouvoir obtenir un poste supplémentaire pour un jeune ayant un BTS.

Enfin, l'accent est mis sur la nécessité absolue d'une interconnexion laboratoire-terrain pour le bon acheminement des échantillons et la communication en retour des résultats, préalable au bon fonctionnement du laboratoire et à la motivation des techniciens et des éleveurs.

CADRE DE LA MISSION

Cette mission s'inscrit dans le cadre des missions d'appui pour le PARC-RCA (financement Union Européenne - 7^{ème} FED). L'objectif de la mission était de fournir un appui au diagnostic au Laboratoire de l'Agence Nationale de Développement de l'Elevage de Bangui. Un programme établi sur deux semaines a été retenu, il contenait un volet d'appui au diagnostic de la peste bovine, peste des petits ruminants et maladies pestiformes assuré par G. LIBEAU et un volet d'appui à celui de la péripneumonie et de la pleuropneumonie caprine, assuré par A. DAVID.

La mission avait pour objectif général la relance du laboratoire par la formation et la sensibilisation du personnel technique afin de répondre à la surveillance des ces maladies épizootiques majeures. L'Afrique Centrale dont la RCA et le Tchad, doivent former une barrière à la réintroduction de la peste bovine vers l'ouest du continent. Absente depuis plus de dix ans d'Afrique de l'ouest et Centrale, la maladie est toujours présente en Afrique de l'Est. Ce personnel doit pouvoir juger, d'un point de vue national, des effets de la vaccination dans le cordon sanitaire et du point de vue régional, des risques de réapparition de la maladie par les échanges commerciaux et par la transhumance du bétail en provenance du Tchad et du Soudan.

Sur le plan spécifique du diagnostic, la mission avait pour but de former le personnel à la mise en œuvre des méthodologies adaptées au dépistage sérologique et antigénique des maladies et/ou à l'évaluation de leur prévalence. Le diagnostic de la peste bovine, de la péripneumonie et des autres maladies citées, est effectué à l'aide de kits ELISA. L'utilisation de tels kits standardisés, préalablement validés, permet une gestion et une interprétation centralisée. Ces méthodologies permettent également l'accréditation des résultats obtenus, par un certain nombre d'autorités internationales (OIE, FAO, AIEA).

La mission a donné lieu à un stage de formation de deux semaines destinées aux deux techniciens de la section "Immunologie" du laboratoire de Bangui.

Cette formation a été l'occasion également :

- de faire le bilan des analyses qui peuvent être actuellement faites et dans l'avenir par le laboratoire de Bangui,
- d'identifier les besoins en consommables et en réactifs pour une année de travail.
- de donner les modalités d'envoi des prélèvements dans les laboratoires de référence extérieurs,
- de proposer une formation continue au techniciens de laboratoires.

Nous tenons à remercier les personnes rencontrées pour leur accueil et leur collaboration, en particulier Guillaume Kondolas pour sa disponibilité durant toute la durée de notre séjour.

1. BILAN

.1 Situation sanitaire

La République Centrafricaine présente une situation sanitaire préoccupante (rapport CIRAD-EMVT ROGER). C'est une zone très sensible sur le plan de l'épidémiologie de la peste bovine et un cordon sanitaire s'est avéré nécessaire à ses frontières pour empêcher la progression de la maladie d'est en Ouest du continent africain.

1.1.1 Peste bovine (RP, liste A) :

Dernière incursion de la peste bovine dans l'Ouest du pays en 1983. Campagnes annuelles de vaccination depuis cette date s'inscrivant dans le cadre général de la stratégie d'éradication de la maladie du continent africain par la PARC.

Les taux de protection du cheptel établis par l'équipe de sérosurveillance demeurent très insuffisants. Cette situation suscite des inquiétudes qui peuvent se justifier par la proximité du Soudan, pays d'enzootie d'où afflue chaque année un nombre important de bétail en transhumance ou destiné à la boucherie (150 000 bovins).

Taux de séroprévalence :

- 1988 : sondage sérologique abattoir	75%
- 1989 : 4000 sérums	(non analysés)
- 1990 : 5718 pour l'ensemble du pays	57%
- 1993 : pour la région Nord (Vakaga, Bamingui-Bango	59%
- 1994, pour l'ensemble du pays	59%

La même année, la séroprévalence au Soudan est de 60% environ (échantillons provenant des zones de Darfur et Khartoum où la vaccination est effectuée). Les vaccinations et les échantillonnages ne sont effectués que de façon épisodique dans la région du sud-Soudan, zone frontalière avec la RCA.

- pas de prélèvement en 1995, 96, 97 en RCA. Reprise en 1998.

Type de vaccin utilisé

-Tissuepest, vaccin monovalent produit par le laboratoire de Dakar (Sénégal). Ce vaccin a été utilisé à l'ouest du pays en 1983.

- Pestbov, vaccin monovalent produit par l'Institut R.Mérieux, utilisé à l'Est du pays en 1983-1984.

- Bissec, vaccin bivalent (peste bovine et péripneumonie) produit par le laboratoire de Farcha (Tchad) utilisé en 1985

- Néobissec, vaccin produit par le laboratoire de Dakar, utilisée sur toute l'étendue du territoire national en 1986.

- Bivax, vaccin bivalent (peste bovine et péripneumonie contagieuse) produit par le laboratoire du LANAVET à Garoua (Cameroun), 1987.

- Bovipestovax (LANAVET).

- Périvax, vaccin monovalent utilisé contre la PPRB à l'Est du pays en 1992.

1.1.2 Peste des Petits Ruminants (PPR, liste A):

D'après le rapport de F. ROGER, un premier foyer s'est déclaré en décembre 1989 à Berbérati, puis Bangui en février 1990. 160 000 petits ruminants avaient été vaccinés (avec le vaccin bovipestique ; effectif estimé : 1,5 millions de tête).

1.1.3 Les maladies pestiformes :

La Maladie des Muqueuse (BVD-MD, liste C), la Rhinotrachéite Infectieuse Bovine (IBR, liste B), le Coryza Gangreneux (liste B), n'ont pas encore été rapporté en RCA. Il s'agit des maladies pestiformes pouvant être confondues avec la peste bovine.

1.1.4 Péripneumonie Contagieuse Bovine (PPCB, liste A, voir F. ROGER) :

"Le dernier foyer confirmé CIRAD-EMVT date de 1993 dans la région de Bambari. C'est le premier foyer déclaré dans la région est. Jusqu'à une période récente (dernier foyer déclaré en 1985), la PPCB était présente à l'Ouest (Région ouest, notamment dans le triangle de Baboua - Bozoum - Bocaranga). La vaccination bivalente a sans aucun doute limité l'apparition de la PPCB-maladie.

1.1.5 Pleuropneumonie Contagieuse Caprine (PPCC, liste B) :

Jamais suspectée.

1.2. Le Laboratoire Vétérinaire de Bangui

1.2.1 Personnel

Si l'on se réfère à l'organigramme du laboratoire de Bangui, la partie "Immunologie" est normalement chargée des analyses sérologiques relatives à la surveillance et à l'évaluation de la couverture vaccinale contre la peste bovine. Le personnel est rattaché au Service d'épidémiosurveillance de la Direction de la Santé Animale, mais dépend également du Coordinateur du PARC. De façon inattendue, cette section est indépendante de la partie "Diagnostic" du laboratoire, section qui devrait regrouper toutes les activités de ce type, sérologie comprise, sous la direction d'une responsabilité compétente.

Quatre personnes ont assisté à l'atelier de formation. Ce stage s'adressait en premier lieu au chef de section "Immunologie" Mr Bruno DOUNIA et à son assistant Mr Barthélémy GNICKOLI. Les autres personnes suivant les exercices qu'en tant qu'observateurs : personnels des sections parasitologie et bactériologie de la partie "Diagnostic" : Mr Vincent ORONOUTCHOU et Mr Edmond BENGBODE. Le manque de matériel et le manque de place n'a pas permis de faire manipuler également ces personnes.

Formation préalable en "Immunologie" : en 1998, deux techniciens dont un de la section anatomo-pathologie ont suivi une formation au diagnostic de la peste bovine et de la PPR au laboratoire de Bingerville (Côte d'Ivoire). Celle-ci a concerné les techniques : C-ELISA PB, Immunocapture PB/PPR, Immunodiffusion en gélose et utilisation du logiciel EDI.

1.2.2 Locaux, équipement et matériel

Le stage de formation à eu lieu au laboratoire de Bangui dans la partie "Immunologie", normalement chargée du diagnostic sérologique peste bovine. Celle-ci comporte une seule pièce de travail climatisée, disposant d'une paillasse permettant le travail de deux à trois personnes et d'un bureau où se traitent les données informatisées. Pour les méthodes de diagnostic qui mettent en jeu le principe de l'ELISA, cette section est équipée de façon assez satisfaisante (lecteur ELISA Multiskan EX, étuve, réfrigérateur, agitateur, matériel informatique, pipetmans, etc...en bon état de marche). **Compte tenu de l'exiguïté du local, le rangement des sérums et des prélèvements est dispersé dans des congélateurs à -20°C, placés dans les pièces adjacentes. La disposition des congélateurs, des sérums et des prélèvements n'est pas optimisée. Une seule pièce devrait être dévolue à leur rangement. Pour minimiser les volumes des sérums, des plaques 96 puits ou des tubes micronics devraient être utilisés. Sérums et prélèvements nécessitent des températures de conservation qui sont respectivement de -20 et de -80°C indispensable pour une conservation sur une période supérieure à 6 mois.**

Le laboratoire est équipé d'une laverie pour le nettoyage de la verrerie, le recyclage du petit équipement en plastique (pipettes, cônes) et la stérilisation du matériel et des milieux ou tampons. Pour les méthodes ELISA, l'accent doit être mis sur la qualité de l'eau afin que celle-ci puisse se rapprocher d'une eau MilliQ. Un distillateur permet d'obtenir une eau de relativement bonne qualité après autoclavage. La qualité de celle-ci pourrait être améliorée en appliquant un deuxième cycle de distillation.

Le laboratoire n'a pas l'équipement nécessaire pour ce qui est des méthodes d'isolement et de diagnostic basées sur la culture cellulaire. Même si la section Bactériologie dispose d'une hotte à flux laminaire, celle-ci ne bénéficie pas d'un contrôle régulier permettant de suivre l'étanchéité de la membrane filtrante. Des sources d'approvisionnement en gaz carbonique, pour une étuve à CO₂ et en azote liquide pour la conservation des cellules, ne sont pas disponibles. Les techniques PCR ne peuvent être envisagées, dans un premier temps, que dans le cas où l'Institut Pasteur serait prêt à mettre son matériel à la disposition du laboratoire de l'ANDE. Ceci suppose également qu'une formation spécifique sur la PCR soit accessible aux techniciens.

2. STAGE

2.1 Réactifs utilisés.

Les kits utilisés sont basés sur le principe de l'ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) qui permettent de réaliser des tests sérologiques et de détection d'antigènes. Plusieurs de ces kits ont été développés par le CIRAD-EMVT en relation avec la Division Jointe FAO/AIEA, ce qui a permis de les valider dans différents laboratoires africains. Certains de ces kits sont commercialisés par une entreprise privée, Biological Diagnostic Supplies Ltd (BDSL; Kilmarnock, RU). Les C-ELISA permettent de traiter environ 4000 à 5000 sérums, et le kit Immunocapture environ 100 échantillons tissulaires. Ils contiennent tous les réactifs entrant dans la composition des tampons de saturation, lavage et révélation nécessaires pour mener à bien le test (voir liste en Tableau I).

Les tests ELISA de compétition (C-ELISA), qui exploitent un anticorps monoclonal, permettent la détection d'anticorps spécifiques dirigés contre un pathogène. Les tests mis en œuvre ont été le C-ELISA PPR, C-ELISA RP, C-ELISA PPCB et le C-ELISA PPCC (kits fournis lors de la mission). Un kit C-ELISA BVD a également été utilisé (LSI - Laboratoire Service International). Il existe deux domaines d'utilisation de ces tests dans le contrôle d'une maladie. Le premier est leur application au "seromonitoring" ou à l'évaluation de la protection après les campagnes de vaccination. Dans ce cas, l'objectif est d'estimer avec quelle efficacité s'est déroulée la vaccination en effectuant des prélèvements selon la stratégie recommandée. La prévalence des anticorps vaccinaux peut être comparée par classe d'âge d'une année sur l'autre. Ceci s'applique dans le cadre du contrôle de la peste bovine dans les cordons sanitaires et également de la PPCB. Le second volet d'utilisation de ces kits C-ELISA est la surveillance de la maladie par la détection d'anticorps en dehors de toute vaccination. Ceci permet d'évaluer, en zones d'enzootie, la prévalence de la maladie, ou en zone indemne, de déclencher le système d'alerte. Ce dernier cas s'applique directement à la peste bovine.

Le kit de détection d'antigène immunocapture (ICE) appliqué à la détection des virus peste bovine et PPR a également été mis en œuvre (kit en stock, fourni préalablement par l'AIEA). Il permet de mettre en évidence la présence de virus directement dans les tissus provenant de l'animal mort ou malade et de réaliser un diagnostic différentiel entre les virus PPRV et RPV. Cette technique a comme principaux avantages, par rapport aux techniques classiques d'identification, d'être rapide et simple d'exécution (2 heures maximum) tout en étant extrêmement spécifique. Il peut être exécuté sur des échantillons qui ont pu subir une rupture de la chaîne du froid.

KIT	CARACTERISTIQUES	NOMBRE D'ECHANTILLONS POUVANT ETRE TESTES	FOURNISSEUR (producteur)	ADRESSE
C-ELISA PPRV	ANTICORPS ANTI- Nucléoprotéine-PPR	4000 SERUMS	CIRAD-EMVT	Campus Baillarguet 34032 Montpellier FRANCE
C-ELISA RPV	ANTICORPS ANTI- Hémagglutinine-RPV	5000 SERUMS	AIEA/BDSL (Pirbright)	Riverbank Business Center, Kilmarnock KA1 3JB UK
IMMUNOCAPTURE	NUCLEOPROTEINE des virus RP et PPR	100 EXTRAITS TISSULAIRES	AIEA/BDSL (CIRAD-EMVT)	Riverbank Business Center, Kilmarnock KA1 3JB UK
C-ELISA PPCB	ANTICORPS SPECIFIQUES de <i>mycoplasma mycoides</i> <i>mycoides</i> SC	4000 SERUMS	CIRAD-EMVT	Campus Baillarguet 34032 Montpellier FRANCE
C-ELISA PPCC	ANTICORPS SPECIFIQUES de <i>mycoplasma capriculum</i> <i>subsp. capripneumoniae</i>	4000 SERUMS	CIRAD-EMVT	Campus Baillarguet 34032 Montpellier FRANCE
C-ELISA BVDV	ANTICORPS ANTI-p80	480 SERUMS	LSI	Le Bois Dieu 69380 Lissieu FRANCE

Tableau I. Récapitulatif des kits mis en jeu.

2.2 Formation réalisée.

Les tests cités plus haut ont été mis en œuvre. Les deux techniciens ont pu réaliser eux-mêmes les techniques. Le principe de chaque test a été expliqué (voir en Annexe, les protocoles des tests). Les échantillons traités ont été analysés grâce au logiciel EDI pour ce qui concerne les C-ELISA PPRV, RPV PPCB, PPCC et l'immunocapture. L'assistance du logiciel permet de contrôler les performances du test et la variabilité entre les essais grâce à plusieurs standards inclus dans chaque kit. Par exemple pour les tests C-ELISA, ce sont des sérums témoins positifs forts, positifs faibles et négatifs. Pour le test d'immunocapture détectant les antigènes RPV et PPRV, les standards inclus sont des antigènes soit, positifs contenant du virus RPV et PPRV, soit, négatif. Les résultats obtenus avec ces témoins ne doivent pas varier au-delà d'un intervalle de confiance préalablement établi, sinon le test doit être recommencé. Concernant l'une ou l'autre des méthodes, les problèmes pratiques auxquels les stagiaires risquent d'être confrontés à l'avenir n'ont pu que leur être exposé de façon théorique : problème d'eau, de pipetage, de pH etc...

2.3. Premiers résultats (voir Tableau II : suspicions légitimes)

2.3.1 Peste des petits ruminants

Pendant la mission, une mise au point du kit C-ELISA PPR (détection d'anticorps) par titrage de l'antigène, a été nécessaire pour permettre son bon fonctionnement, car la qualité de l'eau influe sur la réaction antigène-anticorps. Le kit Immunocapture (détection d'antigène), dont certains réactifs manquaient, ont été renouvelés pendant le temps de la mission : envoi par courrier rapide du CIRAD-EMVT. Ces deux tests ont permis de confirmer d'anciens foyers de PPR (prélèvements gardés au congélateur) et d'en diagnostiquer de nouveaux sur les régions de Birao et de Bossangoa à partir de prélèvement et de sérums réceptionnés le jour même (5 jours d'acheminement) en provenance du terrain et datant de juillet à octobre 1999. Les résultats ont pu être retransmis immédiatement du laboratoire au terrain afin de permettre l'intervention des agents et des éleveurs. **Il est clair qu'un dysfonctionnement existe, à l'heure actuelle, tout le long de la chaîne comprise entre le prélèvement et la restitution des résultats de diagnostic au terrain, incompatible avec le système d'alerte précoce préconisé par l'EMPRES.**

Les tests mis en jeu sont le C-ELISA et l'ICE. Sur 70 sérums de petits ruminants analysés (sérums de l'année 1997 et quelques sérums récents en provenance de Birao : 23/09/99), 7 se sont avérés positifs (6 caprins et 1 ovin) dont les 2 venants de Birao. La positivité de ces derniers a été confirmée en ICE sur les sécrétions nasales et buccales des mêmes animaux. Des frottis nasaux, buccaux et les ganglions mésentériques d'un animal provenant de la région de Bossangoa se sont avérés également positifs par ce test (voir, feuille de lecture ICE du 26/11/99). De retour à Montpellier, la souche RCA-BIRAO.99 a été mise en évidence par PCR et sera séquencée (Figure I). **La suspicion de PPR de Mongoumba n'a pu être confirmée du fait du mauvais choix des prélèvements : sang, rate, foie (voir recommandations).**

Figure I : Test PCR. Mise en évidence d'un fragment de 300 paires de bases spécifiques du virus PPR. Amplification du cDNA de la souche RCA-BIRAO par les amorces NP3 et NP4.



- 1 : Marqueur de poids moléculaire*
- 2 : Souche PPR RCA*
- 3 : Témoin négatif*
- 4 : Témoin positif*

**TABLEAU II: SUSPICIONS LEGITIMES DE PB, PPR ET DE PPCB
RESULTATS SEROLOGIQUES ET ANTIGENEMIQUES**

				anticorps												antigène	
	Type	Poste	Statut	C-ELISA HRPV		C-ELISA N-RPV		C-ELISA NPPRV		SN		C-ELISA PPCB		C-ELISA BVDV		ICE	
Espèce	d'Echantillon	Vétérinaire	Vaccinal	PI	Statut	PI	Statut	PI	Statut	RP	PPR	PI	Statut	PP	Statut	PPR	RPV
ovin/caprin	écouvillon buccal	BIRAO	sans													P	N
	écouvillon buccal	BIRAO	sans													P	N
	sérum	BIRAO	sans	NT		NT		83a	P			NT		NT			
	sérum	BIRAO	sans	NT		NT		80	P			NT		NT			
ovin/caprin	écouvillon nasal	BOSSANGO	sans													P	N
	écouvillon buccal	BOSSANGO	sans													P	N
	écouvillon oculaire	BOSSANGO	sans													N	N
	ganglion mesentérique	BOSSANGO	sans													P	N
	ganglion mesentérique	BOSSANGO	sans													N	N
bovins	sérum	MARKOUNDA	sans	20a	N	49	douteux	NT		P (>1/320)	N	<50a	N	65b	P		
	sérum	MARKOUNDA	sans	14	N	42	N	NT		N	P(1/160)	<50	N	62	P		
	sérum	BOUCA	sans	8	N	54a	P	NT		P (1/20)c	N	30	N	<0	N		

a: seuil de positivité des tests C-ELISA HRPV, NRPV, NPPRV et PPCB à 50%

b: % inh entre 30 et 50% : douteux ou positif faible; % inh entre 50 et 80%: Positif

c: 1/10, seuil de positivité

2.3.2 Peste bovine

Pour la sérologie peste bovine, une centaine de sérums bovins prélevés en 1999 et gardés dans la sérothèque, ont pu être analysés avec le kit C-ELISA H-RP, préconisé par la PARC pour la sérosurveillance de la peste bovine. Nous avons pu constater la bonne marche de ce kit. Ce test permet chaque année d'évaluer la couverture vaccinale des bovins prélevés et permet de traiter environ 5000 échantillons. Il semble que pour l'instant, aucune modification ne soit apportée à ce test, bien que l'on sache qu'il soit peu sensible à la détection des anticorps anti-pestiques dirigés contre les virus RPV de lignée II ainsi que contre les souches asiatiques (lignée III). Les virus de lignée II sont, avec ceux de lignée I, les souches des foyers enzootiques d'Afrique de l'Est. La lignée II, circule à bas bruit, notamment au sud-est du Kenya, sur les bovins transhumants Massai et la faune sauvage, très sensible à ce virus, en est le révélateur de temps à autre.

Le sérum de bovins provenant d'une suspicion légitime de peste bovine (Markounda) mais également d'une suspicion de PPCB (Bouca) ont été analysés (voir Tableau II). A Bangui, les sérums sont restés négatifs avec le kit C-ELISA H-RPV. De retour à Montpellier, ils ont également été analysés avec le kit C-ELISA N-RPV (CIRAD) et la séroneutralisation qui permettent la détection des anticorps antipestiques indépendamment de la nature du virus RPV. **Un des 2 sérums de Markounda et le sérum de Bouca se sont positivés par les deux tests. Pour les 2 origines, ce sont des jeunes animaux qui sont atteints (11 mois, 1 an et 4 ans). A Markounda, la vaccination n'a pas été faite, à Bouca, la feuille d'enquête ne donne aucune indication sur le statut vaccinal du bovin. Une enquête sur le terrain pour retrouver les propriétaires doit permettre d'analyser un échantillonnage plus large d'animaux pour confirmer cette suspicion de peste bovine.** L'un des sérums possède également des anticorps anti-BVD. Ceci permet de dire qu'il existe une circulation du virus de la Diarrhée virale bovine (région Centre), maladie donnant un syndrome de type peste bovine. La présence du virus n'a pu être confirmé. L'utilisation du kit BVDV n'a de sens que si le virus peut être parallèlement isolé sur leucocytes (BVDV Antigen Capture).

2.3.3 Péripleumonie Contagieuse Bovine

Une cinquantaine de sérums de la sérothèque de sérosurveillance ont été analysés avec le kit PPCB afin de mettre en place la technique. Aucun de ces sérums ne s'est révélé positif, ni le sérum provenant d'une suspicion de PPCB sur un bovin de la région de Bouca : pourcentage de compétition de 30%, alors que le seuil du test se situe à 50%.

2.3.4 Pleuropneumonie Contagieuse Caprine

Environ 70 sérums de petits ruminants récoltés en 1997 ont été analysés avec le kit C-ELISA PPCC. La plupart de ces sérums provenaient du pk13 qui est le marché à bestiaux de Bangui. Quelques sérums ont été trouvés positifs. Leur pourcentage de compétition étaient compris entre 20 et 27% (seuil de positivité pour la PPCC : 20%). **Ces résultats confirment pour la première fois, la présence de la PPCC en RCA.**

3. PROPOSITIONS ET RECOMMANDATIONS

3.1 Le laboratoire

3.1.1 Laboratoire et réseau de surveillance

Un diagnostic sûr et rapide ne peut être effectué que par une équipe expérimentée traitant en roulement suffisamment d'échantillons pour maintenir son expertise. Il est donc recommandé qu'il persiste un approvisionnement régulier en réactifs et échantillons biologiques. La mise en routine du travail de diagnostic dépend d'une bonne entente avec le réseau de sérosurveillance sur le terrain, l'utilisation des moyens de transport rapides (avion) pour recevoir dans le temps le plus court les échantillons de terrain. Il est essentiel que le laboratoire puisse communiquer (vacations radio avec certains laboratoires régionaux) avec les équipes de terrain pour obtenir des informations épidémiologiques - mortalité morbidité, symptômes, pour permettre de confirmer le diagnostic. Même si le laboratoire de Bangui peut avoir recours aux Laboratoires Régionaux ou mondiaux pour confirmation ou assurance qualité, il est important qu'il puisse maintenir une expertise pour un premier diagnostic. Il est d'autant plus important pour la peste bovine qu'il y ait un temps de réaction rapide à une alerte, compte tenu de la situation exposée de la RCA.

Conforter la chaîne d'approvisionnement en échantillons :

- codifier les types de prélèvements (Annexe), distribuer un matériel de transport standard, à l'image de ce qui est fait pour la poliomyélite à l'Institut Pasteur de Bangui. Cela passe par la formation (types de prélèvements, reconnaissance des signes cliniques par les auxiliaires vétérinaires) la motivation et l'implication du personnel.

- définir le moyens de transport selon le laboratoire d'origine, sachant les difficultés de circulation au sein de la RCA.

- équipement des laboratoires régionaux avec le matériel de froid, de prélèvement (vacutainers, écouvillons) de conditionnement d'échantillons (tubes, flacons) et kits IDG pour la peste bovine. Amélioration des moyens de communication. Installation de radios etc...

3.1.2 Besoins en réactifs et consommables pour une année de travail (Tableau III IV et V)

* **Réactifs.** Le traitement de 4000 à 6000 sérums par maladie demande l'achat d'environ 1 à 2 kits spécifiques par an. Selon les disponibilité budgétaires, ces kits doivent être renouvelés annuellement. La sérologie de RPV, PPRV, PPCB, PPCC, BVD peut être réalisée d'emblée sur les sérums de la sérosurveillance et également de la sérothèque afin de la valoriser rapidement. D'autres maladies peuvent être diagnostiquées par des tests ELISA commerciaux, leucose, IBR, fièvre de la vallée du Rift (RVF) : travail à effectuer pour Pasteur qui est demandeur.

KIT	CARACTERISTIQUES	PRESENTATION	TARIF INDICATIF	FOURNISSEUR	REMARQUES
C-ELISA N-RPV	Détection des anticorps anti nucléoprotéine de RPV. Utilisable sur sérum individuel	4000 tests	1200 US\$	CIRAD EMVT	Plaques MAXISORB à utiliser.
C-ELISA N-PPRV	Détection des anticorps anti nucléoprotéine de PPRV. Utilisable sur sérum individuel	4000 tests	1200 US\$	CIRAD EMVT	Plaques MAXISORB à utiliser
C-ELISA PPCB	Détection des anticorps anti <i>mycoplasma mycoides mycoides</i> SC. Utilisable sur sérum individuel	4000 tests	2000 US\$	CIRAD EMVT	Plaques POLYSOB à utiliser
C-ELISA PPCC	Détection des anticorps anti <i>mycoplasma capriculum subsp. capripneumoniae</i> . Utilisable sur sérum individuel	4000 tests	2000 US\$	CIRAD EMVT	Plaques POLYSOB à utiliser
C-ELISA BDV	Détection des anticorps anti p80 des virus BVD/MD et BD. Prédétection des animaux IPI. Utilisable sur sérum et lait	5 plaques sécables 480 tests	615 US\$,	LSI*	
C-ELISA IBR	Détection des anticorps anti-IBR gB dans le sérum. Utilisable sur sérum individuel ou mélange	5 plaques sécables 480 tests	250 US\$	LSI	

TABLEAU III. KITS DE DETECTION D'ANTICORPS

* LSI Laboratoire Service International. Le Sémanet IV - 1 bis allée de la Combe - 69380 LISSIEU - FRANCE

Tél.: (33) 4 72 54 82 82 - Fax : (33) 4 72 54 82 83

En antigénémie, la recherche des virus RPV et BVDV ou de PPRV doit être réalisée systématiquement sur tout foyer de suspicion de peste ou de PPR.

KIT	CARACTERISTIQUE	PRESENTATION	TARIF INDICATIF	FOURNISSEUR	REMARQUES
Immunocapture RP et PPR	Détection de la nucléoprotéine de RPV et de PPRV. Utilisable sur organes cibles et leucocytes	100 prélèvements	1200 US\$	BDSL-AIEA	Plaques MAXISORB à utiliser
IDG Peste Bovine (AGID)	Détection des virus RPV et PPRV sans distinction. Utilisable sur organes cibles et leucocytes.	600-1800 échantillons	< 2000 US\$		
BVD/BD Antigène Capture	Détection des antigènes p80 du virus BVD et BD. Utilisable sur sang, leucocyte et organes.	1 plaque sécable 96 tests	260 US\$	LSI	

Tableau IV. KITS DE DETECTION D'ANTIGENE

✱ **Consommables**

QUANTITE	DESIGNATION	Tarif	Ref. Fournisseur
1	Micropipette multicanaux (12 embouts) : volume 5-50 µl. Eppendorf	4650,00 FF	33684 - POLY LABO
2	Micropipette multicanaux (12 embouts) : volume 50-300 µl. Eppendorf	4650,00 FF	33911 - POLY LABO
1	Portoir pour micropipettes	249,00 FF	82849 - POLY LABO
3	Rack à 105 pointes bleues avec fond et couvercle	61,00 FF	82865 - POLY LABO
10	Réservoirs Treff pour réactif ELISA (les dix)	99,00 FF	82854 - POLY LABO
3	Blouses de laboratoire coton L	196,00 FF	54737 - POLY LABO
1	Calculatrice basique F200 + piles	107,00 FF	56706/62101 - POLY LABO
4	Portoirs pour cryotubes (Cryorack)	92,00 FF	13390 - POLY LABO
3	Boîtes de rangement		ROCHE - DIAGNOSTIC
7000	Tubes sec vacutainer siliconé - 10 ml (boîte de 100)	204,00 FF	02150 - POLY LABO
selon disponibilités	Portoirs 96 tubes micronic avec tubes pour stockage des sérums	144,00 FF	46370 - POLY LABO
1	Perforatrice P 212		186 557 GUILBERT
selon disponibilités	Coffret de transport pour échantillons thermosensibles	667,00 FF	69803 POLY LABO

Tableau V. CONSOMMABLES

Adresse Fournisseurs :

POLY LABO. 10 rue de la Durance - 67023 Strasbourg Cedex 1 - Tel 00 33 3 88 65 80 20 - Fax 00 33 3 88 39 74 41 / 65 91 67 -

ROCHE DIAGNOSTIC. 2 Avenue du Vercors - BP 59 - Meylan Cedex - Tel 00 33 4 76 76 30 34 - Fax 00 33 4 76 76 46 30

GUILBERT FRANCE. Avenue du Poteau - 60461 Senlis CEDEX - Tel 00 33 3 44 54 54 54 - Fax 00 33 3 44 54 54 00

3.2 Ressources humaines

Il nous paraît nécessaire que la supervision du laboratoire regroupant l'ensemble des sections "Diagnostic" et "Immunologie" soit faite par un vétérinaire ayant reçu une formation de laboratoire. Il doit être capable de garantir la qualité des analyses et résoudre les problèmes techniques et logistiques pouvant être liés aux analyses ou à l'approvisionnement des échantillons.

Pour le personnel de la section "Immunologie" il est nécessaire d'assurer rapidement une formation complémentaire de 2 à 3 mois dans un laboratoire de diagnostic, IP Bangui, ou CIRAD EMVT. Les principaux handicaps perçus lors de la mission sont une fréquence d'analyses trop basse pour le maintien d'une expertise correcte, une compartimentation et une hiérarchisation des tâches entre les différents techniciens, qui s'oppose à l'exécution, de bout en bout, du travail de diagnostic par une même personne et à la responsabilisation de celle-ci. Il a été également noté que le matériel informatique actuellement utilisé dans le laboratoire est provisoirement prêté (le pc de l'AIEA est en réparation) mais que le personnel n'est visiblement pas habitué à son utilisation et aux logiciels.

Il serait souhaitable que dans le cadre de la relance du laboratoire, l'embauche d'un technicien supérieur de laboratoire puisse se faire. Le laboratoire bénéficierait ainsi d'une remise à jour des connaissances en matière de diagnostic et de conceptions nouvelles de gestion et d'organisation du travail.

4. CONCLUSION

Le laboratoire de diagnostic occupe une place importante dans la structuration d'un réseau de sérosurveillance fonctionnel. La situation particulière de la RCA concernant les risques d'entrée de la Peste Bovine et, d'un point de vue général, la carence importante en données sanitaires, confirment la nécessité de la relance du laboratoire de Bangui.

L'inventaire des ressources de ce laboratoire montre que l'équipement en gros et petits matériels existe. Un certain nombre de techniques de diagnostic basées principalement sur l'usage de kits ELISA peuvent être mises en routine dans le laboratoire. L'utilisation de tels kits standardisés, permet une gestion et une interprétation accréditée par les autorités internationales (OIE, FAO, AIEA).

Cependant l'absence de maintenance pour certains appareils, et un budget de fonctionnement réduit, sont un frein à certaines activités du diagnostic, notamment l'isolement et la conservation des virus thermosensibles comme les virus PPR et RP, l'accès à des techniques de biologie moléculaire (PCR : technique très sensible permettant également de faire le classement des souches en fonction de leur origine géographique).

L'inventaire des ressources humaines, montre que le personnel doit pouvoir bénéficier, pour renforcer son expertise, d'un encadrement technique adéquat, de stages de formation nationaux ou internationaux. Avec la relance du système national de sérosurveillance et l'augmentation du nombre d'échantillons à traiter, le groupe de diagnostic, devrait pouvoir obtenir un poste supplémentaire pour un jeune sortant d'une formation diplômante en techniques de laboratoire.

Enfin, l'interconnexion laboratoire-terrain pour l'acheminement des échantillons et la communication des résultats est un préalable au bon fonctionnement du laboratoire et à la motivation des techniciens et des éleveurs.

ANNEXES

ANNEXES

Table des Annexes

Annexe 1 : Chronogramme et personnes rencontrées	19
Annexe 2 : Abréviations utilisées	22
Annexe 3 : Choix des prélèvements pour le diagnostic.....	23
Annexe 4 : Protocole du kit C-ELISA PPR.....	26
Annexe 5 : Kit ELISA de compétition : PPCB, instructions abrégées	33
Annexe 6 : Kit ELISA de blocage : PPCC, instructions abrégées	36
Annexe 7 : Bibliographie consultée.....	39
Annexe 8 : Photos du laboratoire de Bangui.....	40
Annexe 9 : Fiche d'enregistrement de laboratoire proposée par l'EMPRES	41
Annexe 10 : Procédure de transport d'un cryoconservateur	42

ANNEXE 1

CHRONOGRAMME ET PERSONNES RENCONTREES

ANNEXE 1

Chronogramme et Personnes rencontrées

Déroulement de la mission - 20 novembre au 3 décembre 1999

Samedi 20 novembre :

Déplacement Montpellier - Paris - Bangui ; Départ 19h10

Dimanche 21 novembre :

Arrivée à Bangui de G. LIBEAU et de A. DAVID

Accueil par le Dr Guillaume KONDOLAS

Réunion pour l'organisation de la mission avec Guillaume KONDOLAS, Jean-Jacques TULASNE, Pascal HENDRIKX, et Alain LE MASSON

Lundi 22 novembre :

ANDE

Visite de l'ANDE avec le Dr Fernand KOMANDA, Contrôle Sanitaire

Entretien avec Dr Denis SAPOUA, DSA

Entretien avec le Directeur Général de l'ANDE : Dr Raphaël NGAI YANKOSSE

Entretien avec les techniciens, visite du laboratoire

Contrôle du matériel et des réactifs, mise en route des kits

Mardi 23 novembre :

ANDE

Laboratoire: contrôle des kits mise en place du diagnostic

Discussion avec M Jean-Pierre COMMUNALE, chef d'Agence de la SCAC AIR SERVICE (Montpellier) sur l'acheminement de prélèvements en cryoconservateurs, d'échantillons pathologiques.

Mercredi 24 novembre :

ANDE

Laboratoire: contrôle des kits mise en place du diagnostic

Jeudi 25 novembre :

ANDE

Laboratoire: contrôle des kits mise en place du diagnostic

Vendredi 26 novembre :

ANDE

Laboratoire: contrôle des kits mise en place du diagnostic

Visite de l'Institut Pasteur de Bangui avec le Dr KASSA KELEMBHO

Visite du marché à bétail de PK22

Départ pour la France de G. LIBEAU et de P. HENDRIKX

Samedi 27 novembre :

Repos et rédaction de l'aide mémoire

Dimanche 28 novembre :

Participation à la réunion de sensibilisation à Boali avec J.J. TULASNE, A. LE MASSON, G. KONDOLAS et G. NDAMOYEN ; Retour à Bangui

Lundi 29 novembre :

ANDE

Laboratoire: mise en place du diagnostic

Mardi 30 novembre :

ANDE

Laboratoire: mise en place du diagnostic

Mercredi 1^{er} décembre :

Jour férié en RCA : Fête Nationale

Repos

Jeudi 2 décembre :

ANDE

Laboratoire: mise en place du diagnostic

Vendredi 3 décembre :

ANDE

Laboratoire: mise en place du diagnostic

Départ pour Paris - Montpellier d'A. DAVID et de J.J. TULASNE et de A. LE MASSON :
vol international de nuit.

Personnes rencontrées

AGENCE NATIONALE DE DEVELOPPEMENT DE L'ELEVAGE (Bangui) :

Dr Raphaël NGAYE YANKOSSE Directeur Général par intérim,
Dr Denis SAPOUA, Directeur du Service Santé Animale,
Dr Guillaume KONDOLAS, Coordinateur du projet PARC,
Dr Ginette ALI AMARA, Chef de Service du Diagnostic,
Dr Fidèle Dieudonné KAYONGO, Chef de Service Epidémiologie,
Dr Fernand KOMANDA, Chef de Service du Contrôle Sanitaire,
Mr Bruno DOUNIA, Chef de Section Immunologie,
Mr Barthélémy GNIKOLI, Assistant de Section Immunologie,
Mr Vincent ORONOUTCHOU, Chef de Section Parasitologie,
Mr Edmond BENBODE, assistant Section Parasitologie,
Mr Marcel GUERET, Chef de Section Anatomo-pathologie,
Mr Jean-Christophe MBOULOUNOU, Chef de Section Bactériologie.

INSTITUT PASTEUR BANGUI :

Dr KASSA KELEMBHO, Chef de laboratoire des mycobactéries,
Dr Ionela GOANDJIKA, chef de laboratoire des entérovirus.

CIRAD (Montpellier - France) :

Dr Philippe CHARDONNET, EMVT, mission préparatoire pour le volet faune
sauvage PARC,
Mr Christian GOUNEL, TERA, en poste à l'ICRA, Bangui pour le projet PRASAC.

SCAC AIR SERVICE (Montpellier – France) :

Mr Jean-Pierre COMMUNALE.

ANNEXE 2

ABREVIATIONS UTILISEES

ANNEXE 2

Abréviations utilisées

AIEA:	Agence Internationale pour l'Energie Atomique
ANDE:	Agence Nationale pour le Développement de l'Elevage
C-ELISA:	ELISA de compétition
ELISA:	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMPRES:	Emergency Prevention System against transboundary animal and plant pests and diseases
ICE:	Immunocapture ELISA
IDG:	Immunodiffusion en Gélose (AGID pour le terme anglais)
IPB:	Institut Pasteur de Bangui
OIE:	Office International de Epizooties
PACE:	Pan African Programme for the Control of Epizootics
PARC:	Pan African Rinderpest Campaign
PB:	Peste Bovine
PPCC:	Pleuropneumonie Contagieuse Caprine
PPCB:	Péripneumonie Contagieuse Bovine
PPR:	Peste des Petits Ruminants
PPRV:	Virus PPR
RPV:	Virus PB

ANNEXE 3

CHOIX DES PRELEVEMENTS POUR LE DIAGNOSTIC

Choix des prélèvements pour le diagnostic de la PB et de la PPR

Echantillons à prélever pour la détection d'antigène et l'isolement du virus

- à partir de l'animal vivant, les échantillons à prélever sont :

- * écouvillons de l'épithélium nasal et oculaire
- * lésions buccales (débris cutanés)
- * sang sur héparine ou EDTA
- * biopsie des ganglions pré scapulaires

- à partir de l'animal mort

- * ganglions
- * poumon
- * rate
- * amygdales
- * intestin grêle (Plaques de Peyer)

Les chances d'isoler le virus sont plus grandes quand les échantillons sont prélevés au début de la maladie avant l'apparition des anticorps (le titre du virus décroît alors rapidement) et la surinfection bactérienne. Aussi il est recommandé de faire l'euthanasie des animaux durant la phase d'hyperthermie.

Isolement

* Cellules: cellules de mouton ou de chèvre de première explantation (poumon ou rein), cellules de rein de singe Vero.

* Ensemencement:

- sur cellules en tapis. Ensemencer un flacon de 25 cm² avec les cellules. Après 4-6 heures d'incubation à 37°C, le milieu de culture est enlevé. Le tapis non confluent est inoculé avec 0.5-1 ml de suspension pathogène puis est incubé 1 h à 37°C pour permettre l'adsorption du virus. L'inoculum est alors éliminé et du milieu de culture contenant 5% de sérum de veau fœtal (SVF) est remis dans le flacon (doubler la concentration normale d'antibiotiques).

- sur cellules en suspension. Les cellules fraîchement trypsinées et la suspension pathologique (1 ml dans flacon de 25 cm²) sont incubées ensemble à 37°C. Au bout d'1 h d'incubation du milieu frais est rajouté (5% SVF). Il doit contenir deux fois la concentration normale d'antibiotiques. Avec le poumon et les ganglions à 10%, il est recommandé de faire des inoculums de 0,1 et 1 ml pour minimiser l'effet cytotoxique.

✱ **Entretien et passages à l'aveugle**

Au jour 1 et 2, le milieu doit être changé, la concentration d'antibiotiques baissée à la normale. Puis le milieu doit être changé systématiquement tous les deux jours. Dès que les cellules sont confluentes réduire la concentration de sérum à 2% (milieu d'entretien). Après une semaine d'incubation, si l'effet cytopathogène (ECP) n'est pas visible, il est nécessaire de faire un passage à l'aveugle (trypsiner les cellules) et changer le milieu tous les deux jours ensuite. Un second passage à l'aveugle est parfois utile après une semaine d'observation.

Il est à noter que l'ECP est souvent long à se développer (de 7 à 20 jours). Il est caractérisé par l'apparition de syncytiums de taille moyenne dans les cellules de mouton et de chèvres. Mais dans les cellules Vero, il est rare de voir ces cellules multinucléées. L'ECP est caractérisé par l'apparition de cellules rondes qui se détachent progressivement du tapis cellulaire.

***Choix des prélèvements pour
le diagnostic de la PPCB et de la PPCC***

Echantillons à prélever pour la détection d'antigène et l'isolement du mycoplasme

Sur animal mort : liquide pleural et poumon.

Modalité d'envoi des prélèvements dans les laboratoires

Les échantillons doivent être envoyés aussi vite que possible au laboratoire de diagnostic dans un container isolé (polystyrène expansé, voir référence en Tableau V Consommables). Les échantillons destinés à la sérologie, la détection de l'antigène et/ou à l'isolement doivent être envoyés sous glace (pas de glycérol additionné au échantillons). Au laboratoire si les échantillons ne peuvent être analysés immédiatement, ils doivent être stockés à -80°C (le sang collecté sur anticoagulant doit être centrifugé pour la récoltes des leucocytes avant congélation). Si le laboratoire est localisé dans un pays étranger, l'envoi doit se faire sous carboglace ou azote liquide. Toutes les consignes internationales d'expédition doivent être respectées pour d'une part, éviter la dissémination du virus et d'autre part, se conformer à la législation vétérinaire du pays destinataire (voir procédures de transport fournies par la SCAC AIR SERVICE, Annexe 10)

Laboratoires de référence

CIRAD-EMVT, Montpellier

- *PPCB: Laboratoire Mondial de la FAO
- *RP - PPR : Laboratoire de référence de l'OIE
- *PPR: Laboratoire de référence Régional -Afrique Asie - de la FAO

LANADA/LCPA, Bingerville, BP 206 Côte d'Ivoire

- *RP - PPR: Laboratoire Régional (AIEA).

ANNEXE 4

PROTOCOLE DU KIT C-ELISA PPR

ANNEXE 4

Protocole du kit C-ELISA PPR

Centre d'Application et de Méthodologie de Diagnostic des Maladies
Animales de l'Office International des Epizooties (CAMDA / OIE)

PESTE DES PETITS RUMINANTS ELISA KIT

COMPETITIVE ENZYME IMMUNOASSAY FOR DETECTION OF
ANTIBODY TO PESTE DES PETITS RUMINANTS

JANUARY 1999

INTRODUCTION

The kit uses a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of specific peste des petits ruminants (PPR) antibody in serum. The test depends on inhibition of the binding of a mouse monoclonal antibody (mAb) to a PPRV-specific epitope in the presence of positive serum. Inhibition is detected as a reduction in the OD reading obtained with the mAb alone following the addition of peroxidase labelled anti-mouse conjugate and substrate/chromogen mixture. Sera can be tested at a final dilution of 1/20 or titred after serial dilution.

A threshold value of 50% inhibition is adopted for routine screening.

The mAb supplied is directed against the nucleoprotein (N) of the peste des petits ruminants virus.

The peste des petits ruminants antigen supplied consists of PPR-N protein produced in insect tissue culture cells infected with a recombinant baculovirus.

EQUIPMENT AND REAGENTS

Photometer

Flow laboratories, Titertek Multiskan MK II automate reader (or equivalent) with an interference filter of 492 nm.

Orbital shaker

Water purification system

Minimum ; glass-distilled or deionized water

Optimum ; Millipore, Milli-Q (or equivalent), Type I, 18 megohm, pyrogen-free water.

Microelisa plates

Nunc Immuno I Maxisorp (cat. 439454).

Incubator

Any type of warm wall incubator maintained in the range of +35°C to +39°C.

Antigen stock

Recombinant N-PPR antigen.

- insect cell culture derived
- stock solution supplied in 1 ml vials; store at - 20°C
- it can be thawed and refrozen several times without significant loss of activity if **maintained meanwhile at 4°C**.

Anti-PPR Monoclonal Antibody stock

Anti-PPR monoclonal culture supernatant.

- freeze dried stock solution supplied in 1 ml vials; store at 4°C.
- reconstitute the freeze dried content of a vial with 1 ml of distilled/deionized water; store at - 20°C.

Anti-mouse conjugate stock

Rabbit anti-mouse immunoglobulin HRPO conjugate (Dako, P 260)

- store at 4°C.

Control serum stock

Control serum (C++, C+ and C-) supplied in 1 ml vials; reconstitute the freeze dried content of a vial with 1 ml of distilled/deionized water; store at -20°C .

- they can be thawed and refrozen several times without significant loss of activity.

Chromogen stock

OPD tablets (30 mg); store at 4°C .

- Dissolve one tablet in 75 ml distilled/deionized water (0.04%, 3.7 mM) and store at 4°C in the dark. Aliquots of 10 ml volumes can be stored at -20°C until use.

Substrate stock

Perhydrit tablets; store at room temperature.

- Dissolve one tablet in 10 ml distilled/deionized water (3% solution, 882 mM) and store at 4°C . Immediately before use add 40 μl of this solution to every 10 ml of OPD solution.

Coating buffer

Phosphate buffered saline (PBS, 0.01 M, pH 7.4, see appendix).

- 10x stock solution can be prepared and kept at room temperature after sterilization.

Blocking buffer

PBS + 0.05% (v/v) Tween 20 + 0.5 % negative lamb serum (C-control). Store at 4°C . Use fresh buffer each day.

Wash buffer

- Dissolve PBS 1/5 in distilled/deionized water, add 0.05% (v/v) Tween 20.

Stopping solution

Sulfuric acid (1 M).

- slowly add 55 ml of concentrated sulfuric acid to 945 ml of distilled/deionized water. Store at room temperature.

PLATE LAYOUT

Conjugate control (Cc)

Wells A1 and A2 are the conjugate control; they contain only N-PPR antigen and conjugate.

MAb control (Cm)

MAb control includes wells F1, F2, G1 and G2 which consist of N-PPR antigen, mAb and conjugate. They give the maximum OD reading expected in the absence of competing antiserum.

Strong positive control (C++)

Strong positive control includes wells (B1, B2, C1 and C2) which contain N-PPR antigen, strong positive serum, mAb and conjugate. They act as quality control wells: similar levels of inhibition should be obtained between tests. **PI values must stay between 85 and 95%.**

Weak positive control (C+)

Weak positive control includes wells D1, D2 E1 and E2 which consist of N-PPR antigen, weak positive serum, mAb and conjugate. **PI values must stay between 65 and 75%**

Negative control (C-)

Negative control includes wells (H1 and H2) with N-PPR antigen, negative serum, mAb and conjugate. **PI values are around 30%**

Serum samples

Using the test format (Fig 1), 40 sera can be tested in duplicate at a final dilution of 1/20.

TEST PROTOCOL

1) N-PPR antigen must be diluted in PBS according to a dilution factor which depends of the antigen batch number (the batch 99-1 must be diluted 1/1600). Add 50 μ l of antigen solution to all wells of the plate; tap the side of the microplates to ensure that the antigen is evenly distributed over the bottom of each well. Incubate 1 hour at 37°C on an orbital shaker.

2) Wash plates three times in washing buffer and blot dry.

3) Add 45 μ l of blocking buffer to all wells of the plate. Then add a further:
. 5 μ l of blocking buffer to the monoclonal control wells (F1, F2, G1 and G2).

. 55 μ l of blocking buffer to the conjugate control wells (A1 and A2).

. 5 μ l of test serum to test wells.

. 5 μ l of strong positive control to control wells (B1, B2, C1 and C2).

. 5 μ l of weak positive serum to control wells (D1, D2, E1 and E2).

. 5 μ l of negative serum to control wells (H1 and H2).

. 50 μ l of monoclonal antibody, diluted 1/100 in blocking buffer to all wells of the plate **except the conjugate control (A1 and A2)**.

Incubate 1 hour at 37°C on orbital shaker.

4) Wash the plates three times and blot dry.

5) Add 50 μ l of anti-mouse conjugate diluted 1/1000 in blocking buffer. Incubate 1 hour at 37°C.

6) Wash the plates three times as before.

7) Prepare OPD solution by adding just before use H₂O₂ 3% solution. The final substrate/chromogen solution must be colorless and kept until use at 4°C in the dark. Add 50 μ l of substrate/chromogen mixture in each well. Color development is stopped after 10 mn by adding 50 μ l of 1 M H₂SO₄. Read with an ELISA reader at 492 nm. Use a blanking plate (i.e. column 1 filled with substrate and stopping solution).

8) The inhibition of mAb binding in the presence of serum is expressed as percentage inhibition (PI), calculated from mean OD values using the formula:

$$PI = 100 - [(OD \text{ of the test wells} / OD \text{ of the Cm wells}) \times 100]$$

$$PI = 100 - [(OD \text{ of the test wells} / OD \text{ of the Cm wells}) \times 100]$$

Sera showing PI greater than 50% are considered to be PPR positive.

APPENDIX

PBS (1x) 1 litre

. NaCl.....	.8 g
. KCl.....	0.2 g
. Na ₂ HPO ₄ anhydre	1.44 g
. KH ₂ PO ₄	0.24 g

- in 800 ml distilled/deionized water
- pH to 7.2, and volume up to 1 l

ANNEXE 5

**KIT ELISA DE COMPETITION : PPCB,
INSTRUCTIONS ABREGEES**

Kit ELISA de compétition: PPCB
instructions abrégées

I. Sensibilisation des plaques

Diluer l'antigène lysé au 1/2000 dans du PBS.

Distribuer 100 µl de l'antigène dilué dans tous les puits des plaques.

Couvrir les plaques ainsi sensibilisées avec une feuille de papier aluminium et les incuber 2 heures à 37 °C ou une nuit à +4 °C.

II. Distribution des sérums et du Mab

Les sérums sont préalablement dilués dans une autre plaque. Ces dilutions doivent être faites juste avant de tester les sérums.

Répartir 100 µl de tampon de dilution dans tous les puits de la plaque de dilution. Cette plaque doit être ordinaire, sans activité d'absorption, comme les plaques utilisées pour les réactions de fixation du complément (RFC).

Distribuer 11 µl de sérum dans les puits appropriés, en incluant les trois sérums de contrôle : le fortement positif, le positif et le négatif.

Préparer l'anticorps monoclonal (Mab), en diluant le contenu du flacon (mab 117-5 batch 04) dans 30 ml de tampon de dilution. Additionner 110 µl du Mab ainsi dilué aux sérums dilués, ainsi que dans les puits du Cm (Contrôle monoclonal), mais surtout pas dans les puits A1 et A2 du Cc (Contrôle conjugué), où le Mab sera remplacé par du tampon de dilution.

Jeter l'antigène des plaques en retournant celles-ci vigoureusement dans l'évier. Les laver une fois dans le tampon de lavage. Eliminer l'excédent de tampon de lavage en tapotant la plaque retournée sur du papier absorbant.

Distribuer le mélange « sérum/Mab », à l'aide d'une pipette multicanaux, à raison de 100 µl par puits.

Incuber les plaques pendant 1 heure à 37 °C, sous agitation douce.

III. Distribution du conjugué

Oter le mélange sérum/Mab des plaques par retournement et les laver deux fois dans le tampon de lavage.

Diluer le conjugué (Dako P260) au 1/1500 dans le tampon de dilution (32 µl pour 48 ml de tampon de dilution), et distribuer 100 µl par puits.

Incuber les plaques à 37 °C pendant 1h sous une agitation douce.

IV. Distribution du substrat

- Enlever le conjugué et laver les plaques dans trois bacs de tampon de lavage
- Distribuer le substrat fraîchement préparé dans tous les puits (100 µl /puits)
 - Incuber, les plaques à 37°C, sous agitation modérée, jusqu'à ce que la D.O. dans les puits du contrôle monoclonal soit comprise entre 0,8 et 1,6 à 405 nm.

V. Lecture des résultats

Vérifier les contrôles :

- le contrôle-100 % (Contrôle Conjugué) doit avoir une D.O inférieure à 0,120
- le contrôle 0 % (Contrôle Mab) doit avoir une D.O comprise entre 0,8 et 1,6.

Le pourcentage de compétition est donné par la formule :

$$P.I = 100 [(DO Mab - DO Test) / (DO Mab - DO conj)]$$

Où la *DO Mab* est la moyenne des contrôles 0% et la *DO conj* est la moyenne des contrôles 100%.

- Le sérum de contrôle négatif doit être compris entre 0-25 %
- Le sérum de contrôle positif doit être compris entre 38-58 % (ref. M)
- Le sérum de contrôle fortement positif doit être compris entre 58-78 % (ref. 99028)

Les dupliqués pour chaque sérum ne doivent pas différer de plus de 10 %.

Si dans une plaque (40 sérums), il y a 5 dupliqués qui diffèrent de plus de 10%, alors cette plaque est non valable et les sérums doivent être re testés.

Calcul de la moyenne entre deux dupliqués, si leurs différences sont inférieures à 10%.

Résultats:

- Les valeurs inférieures à 40% sont considérées négatives
- Les valeurs supérieures à 50 % sont considérées positives
- Les valeurs comprises entre 40 et 50% sont considérées douteuses.

Préparation des réactifs

Tampon de dilution :

PBS pH 7,6

0,5 % de sérum de cheval

0,05 % tween 20.

Diluer 20 ml de PBS concentré (10X) dans 180ml d' eau distillée, et ajouter 1ml de sérum de cheval et 1 ml de Tween 20 à 10%.

Tampon de lavage :

PBS dilué au 1/5 dans l' eau distillée

0,05% Tween 20.

Diluer 20 ml de PBS concentré (10X) dans 1 litre d' eau distillée, et ajouter 0,5 ml de tween 20.

Substrat:

Ajouter à 24 ml de tampon citrate, 600 μ l d' ABTS concentré (ou 2 comprimés d'ABTS de 10 mg). et 120 μ l d' H₂O₂ à 3%.

Tampon citrate :

Dissoudre les deux tubes contenant l' acide citrique et le citrate, dans un litre d' eau distillée. Conserver à +4 °C.

ABTS concentré

Ajouter 12 ml d' eau distillée au tube contenant 263 mg d' ABTS, conserver à l' abris de la lumière, à, +4 °C pendant 1 mois.

H₂O₂ à 3% :

Ajouter 10 ml d' eau distillée au tube contenant le comprimé. La dissolution complète prends 30mn, conserver ensuite à +4 °C.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Cc	Cc	1	5	9							
B	++	++	1	5	9							
C	++	++	2	6	10							
D	+	+	2	6	10							
E	+	+	3	7	...							
F	Cm	Cm	3	7	...							
G	Cm	Cm	4	8								
H	-	-	4	8								

Cc: contrôle conjugué (pas de sérum, ni de Mab = 100% de compétition)

Cm: contrôle monoclonal (pas de sérum = 0% de compétition)

++: sérum fortement positif ;

+: sérum modérément positif ;

-: sérum négatif.

ANNEXE 6

**KIT ELISA DE BLOCAGE : PPCC,
INSTRUCTIONS ABREGEES**

Kit ELISA de blocage / PPCC
instructions abrégées

I. Sensibilisation des plaques'

- Dilution de l'antigène lysé, au 1/320 dans du PBS 1X
- Distribuer 50 μ l d'antigène dilué dans tous les puits de la plaque (Maxisorp).
- Recouvrir les plaques avec une feuille d'aluminium et les laisser une nuit à +4°C ou 2 heures à +37°C.

II. Distribution des sérums

* Les sérums doivent être préalablement dilués dans une plaque dite de dilution (Greiner). Cette dilution doit être faite juste avant de tester les sérums :

- Répartir 190 μ l de tampon de dilution dans tous les puits de la plaque. (sauf puits des contrôles)
- Distribuer 10 μ l de sérum dans les puits appropriés, agiter doucement pour assurer une bonne homogénéisation.

* Sérums de référence :

Ils sont faits à partir de deux dilutions d'un même sérum fortement positif :

- Le sérum fortement positif = diluer «95.1» (préalablement reconstitué avec 0.5ml) au 1/40

- Le sérum positif = diluer «95.1» au 1/160

Répartir 50 μ l dans les puits correspondants :

- contrôle ++ : position B1, B2, C1, C2
- contrôle + : position D1, D2, E1, E2

* Incubation des sérums :

- Jeter l'antigène des plaques par retournement. Laver les une fois dans le tampon de lavage.

- alors, distribuer les sérums à tester avec une pipette multicanaux (50 μ l / puits)

- Incuber les plaques couvertes à 37°C pendant une heure sous une douce agitation.

III. Distribution du monoclonal

- Préparer l'anticorps monoclonal (Mab) en diluant le flacon de Mab 4-52, dans 25ml de tampon de dilution.
- Oter les sérums des plaques par renversement et les laver deux fois (dans tampon de lavage).

Attention : ne pas oublier les contrôles !

cc : **contrôle conjugué** (Pas de sérum, ni de Mab = 100 % compétition) [position : A1,A2]

cm : **Contrôle de l'anticorps monoclonal** (Pas de sérum = 0 % compétition) [position : F1, F2,G1,G2]

- Distribuer le Mab rapidement (50 μ l/puits)-excepté dans les puits A1 et A2 où le Mab est remplacé par du tampon de dilution.
- Incuber les plaques couvertes à 37°C pendant 30 mn sous agitation douce.

IV. Distribution du conjugué

- Oter le Mab des plaques par retournement et les laver deux fois dans le tampon de lavage.
- Distribuer le conjugué (Dako P260 dilué au 1/400 dans le tampon de dilution (50 μ l /puits)).
- Incuber les plaques à 37°C pendant 30 mn sous une agitation douce.

V. Distribution du substrat

- Enlever le conjugué et laver les plaques dans trois bacs de tampon de lavage
- Distribuer le substrat fraîchement préparé dans tous les puits (100 μ l /puits)
- Incuber les plaques à température ambiante jusqu'à ce que la D.O. dans les puits du contrôle monoclonal soit comprise entre 0,8 et 1,6 à 405 nm.

VI. Lecture des résultats

✱ Vérifier que les contrôles sont bons

- le contrôle 100 % (Contrôle Conjugué) doit avoir une D.O inférieure à 0,120
- le contrôle 0 % (Contrôle Mab) doit avoir une D.O comprise entre 0,8 et 1,6.

Le pourcentage de compétition est donné par la formule :

$$P.I = 100 [(OD Mab - OD Test) / (OD Mab - OD conj)]$$

où *OD Mab* la moyenne des contrôles 0% et *OD conj* est la moyenne des contrôles 100%.

- Le sérum de contrôle négatif doit être compris entre 0-20 %
- Le sérum de contrôle positif doit être compris entre 30-50 %

Le sérum de contrôle fortement positif doit être compris entre 65-85 %

* Les duplicués pour chaque sérum ne doivent pas différer de plus de 10 %.

Si dans une plaque (40 sérums), il y a 5 duplicués qui diffèrent de plus de 10%, alors cette plaque est non valable et les sérums doivent être retestés..

* Calcul de la moyenne entre deux duplicués, si leurs différences est inférieure à 10%.

* Résultats:

- Les valeurs inférieures à 15% sont considérées négatives
- Les valeurs supérieures à 20 % sont considérées positives
- Les valeurs comprises entre 15 et 20% sont considérées douteuses.

ANNEXE 7

BIBLIOGRAPHIE CONSULTEE

ANNEXE 7

Bibliographie consultée

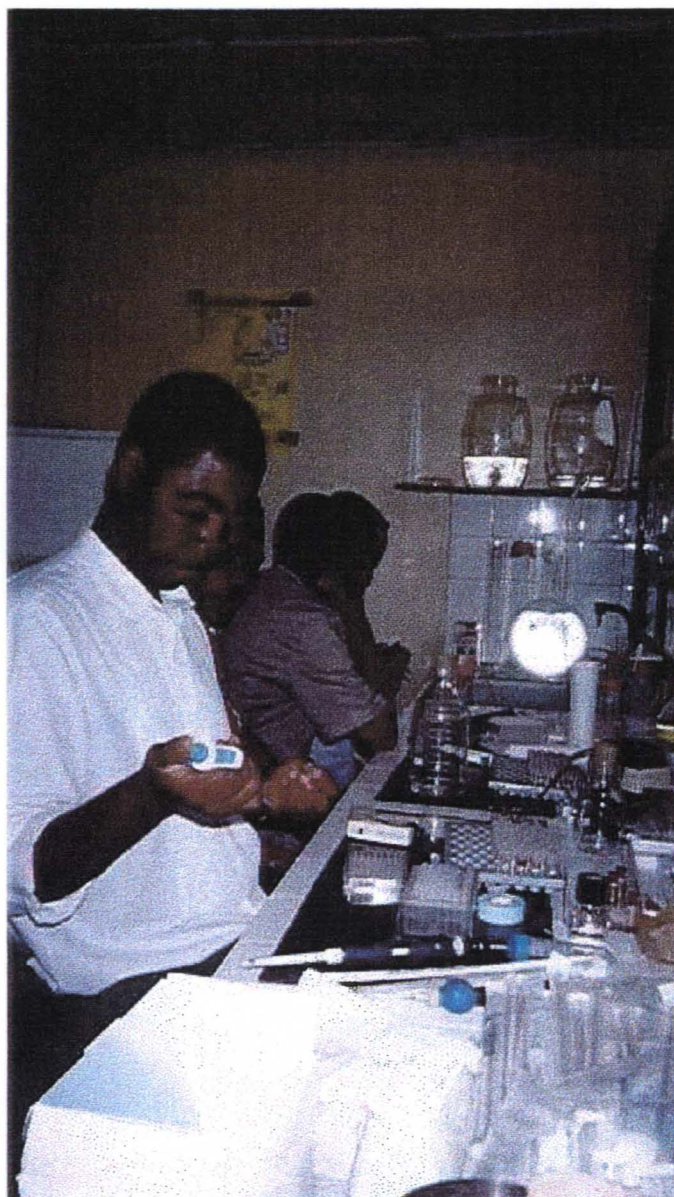
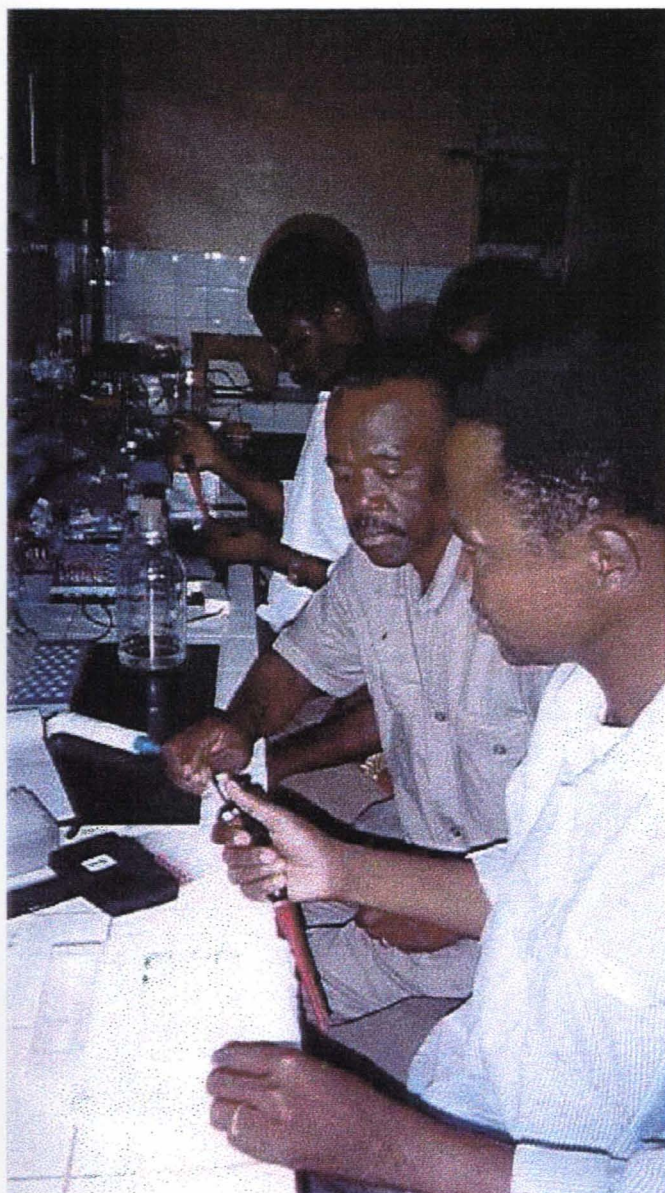
CIRAD-EMVT/ ROGER 1998. Mission d'appui aux laboratoires de diagnostic.
Marché « Assistance Technique Mission d'Appui ANDE/CIRAD-EMVT ».

Documents AIEA. The sero-monitoring of rinderpest throughout Africa.
Phase II. Results for 1992, 1993, 1994.

ANNEXE 8

PHOTOS DU LABORATOIRE DE BANGUI

Photos du laboratoire de Bangui



ANNEXE 9

**FICHE D'ENREGISTREMENT DE LABORATOIRE
PROPOSEE PAR L'EMPRES**

**FICHE D'ENREGISTREMENT / FICHE DE RESULTAT
REDIGEES, PROPOSEES PAR LE CIRAD LORS DU STAGE A
BANGUI**

ANNEXE 9

***Fiche d'enregistrement de laboratoire
Proposée par l'EMPRES***

***Fiche d'enregistrement & fiche de résultat
rédigées, proposées par le CIRAD lors du stage à BANGUI***

Please mark with an X if samples to lab:

Reverse of abattoir and field disease report form:**DETAILS FOR SPECIMEN(S) LABORATORY**

Number & type of specimen(s):	Time collected (only for sensitive organisms):	In case of RABIES, was there any human contact: [Yes] [No] If Yes, how many people affected .
	Examination(s) requested:	Owner's name on reverse of this form: Owner's address: Owner's tel. number:
	ID and reference number if from satellite laboratory:	If not official – does lab have permission to do extra test at owner's cost: [Yes] [No] Costing: [Official] [Post price list]

FOR LABORATORY USE ONLY

Date samples received	Lab number	Number copies required			Distribution
Sections	micro/path	path	chem tox	Referral centres (specify)	Add. examination decided upon
	nutr	virol	serol		
Is this a follow-up report	Yes	No	Another report to follow	Yes	No

LAB RESULT (FREE FORMAT)

--

LABORATORY COMMENT TO FIELD VET:

--

PATHOLOGY

Blood smear:	Respiratory system:
Eggs per gram:	Central nervous system:
General:	Musculoskeletal system:
Body cavities:	Skin:
Gastrointestinal tract:	Other:
Liver:	Pathological diagnosis:
Urogenital system:	Aetiological diagnosis:
Circulatory system:	Differential diagnosis:
Lymphnodes:	

COMMENT/RECOMMENDATION:

--

[back to top](#)**Appendix I: Random sampling design****Sampling methods in randomised surveys**

Conceptually, there are a number of steps involved in a disease survey. They are laid out below in a stepwise manner and will be explained in more detail later.

1. Sampling Frame

The construction of a sampling frame is the first step in the planning of a survey, and will be a reflection of "what question must this survey answer?" The sampling frame is a list of the "objects" in the sampling universe, giving the

ANDE - LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE

Diagnostics sérologiques

Bangui - RCA

Fiche d'enregistrement des prélèvements à analyser

Date de réception:	
Région d'origine:	
N° d'enregistrement:	

Nature des prélèvements:

Espèce:		Organes, remis à:	
Nb de sérums:		Autre:	
Date du prélèvement:			

Analyse demandée:

cELISA - PPCB		cELISA - PB	
bELISA - PPCC		cELISA - BVD	
Agglutination PPCB		bELISA - IBR	
Immunocapture PPR		Aggl brucellose	

Nom et adresse du Demandeur:

Propriétaire:

Réceptionné au labo, par:

Conservé à, et où:

Commémoratifs:

Résultats:

Analyse effectuée le:

par:

Résultats transmis le:

à:

ANDE - LABORATOIRE CENTRAL VETERINAIRE

Service des Diagnostics

Bangui - RCA

Fiche de résultats

Région:	Secteur:	Poste vét. :
Localisation:		
Prélèvements réalisés par:		le:

	Animal (espèce-sexe-âge)	Prélèvements	Recherches effectuées	Résultats
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Conclusions:	Le:
Diagnostic:	

Analyses effectuées par:

Le Chef de Service des Diagnostics,

Docteur Vétérinaire.

ANNEXE 10

PROCEDURES DE TRANSPORT D'UN CRYOCONSERVATEUR

ANNEXE 10

Procédures de transport d'un cryoconservateur

Procédures de transport d'un cryoconservateur (azote liquide)
avec prélèvements sanguins de bovins.

France / RCA / France

Pour le compte du CIRAD et A.N.D.E. dans le cadre du programme PARC / OUA

A - Transport MONTPELLIER / PARIS / BANGUI

- 1 - Ordre de transport du CIRAD à SCAC MPL le lundi
- 2 - Demande de réservation par SCAC MPL le lundi
- 3 - Préavis d'expédition par SCAC MPL à SDV BGF le mardi
- 4 - Enlèvement du cryoconservateur + documents originaux le jeudi
- 5 - Douanes export + LTA le jeudi
- 6 - Transfert du container à AF MPL le jeudi pour vol MPL / CDG
- 7 - Préparation par AF CDG sur vol AF ou RK du week-end
- 8 - Fax de préavis d'embarquement par SCAC MPL le jeudi à :

CIRAD MPL
SDV BGF
ANDE BGF

avec copie LTA + documents CIRAD

- 9 - Fax de confirmation d'embarquement par SCAC MPL le lundi à :

CIRAD MPL
SDV BGF
ANDE BGF

B - FORMALITES DE TRANSIT A L'IMPORTATION EN RCA

- 1 - A réception du préavis d'expédition (A-1) et avant expédition, prévenir SCAC MPL de tout empêchement, anomalie ou problème local susceptible de contrarier la bonne livraison du cryoconservateur à l'A.N.D.E.
- 2 - Confirmation d'arrivée ou de non réception par fax de SDV BGF à SCAC MPL le lundi matin
- 3 - Demande de BAE auprès des Douanes de l'aéroport.
- 4 - Livraison à l'A.N.D.E. par SDV BGF le lundi dans la journée
- 5 - POD de SDV BGF à SCAC MPL

C - TRANSPORT BANGUI / PARIS ROISSY CDG

- 1 - Après livraison à l'A.N.D.E. prévoir avec le Dr Guillaume KONDOLAS la réexpédition sur PARIS et récupérer l'ordre de transit
- 2 - Demande de réservation sur AF ou RK le mardi
- 3 - Prévision d'expédition le mardi / mercredi de SDV BGF à :
ANDE BGF
SCAC MPL
- 4 - Préparation dossier export (douanes vétérinaire, LTA) au plus tard le jeudi
Consignation LTA à SCAC Air Service ROISSY p/c SCAC MPL
Notify LTA au CIRAD MPL
- 5 - Enlèvement par SDV BGF chez l'A.N.D.E. du cryoconservateur + documents originaux au plus tard le vendredi pour remise directe en compagnie à l'aéroport de BGF avec LTA + documents (original du certificat sanitaire).
- 6 - Fax de SDV BGF à SCAC MPL le vendredi avec copies LTA / certificat sanitaire / attestation ANDE
- 7 - Vérifier embarquement pendant le week-end.
- 8 - Confirmation de SDV BGF à SCAC MPL + ANDE BGF par fax sur LTA avec mention "OK embarqué" ou "NON embarqué".
- 9 - Si "NON embarqué" avis de SDV BGF à SCAC MPL + ANDE BGF avec motif du non embarquement et nouvelles coordonnées de vol.

D - TRANSIT A ROISSY ET REEXPEDITION SUR MONTPELLIER

- 1 - Confirmation de l'arrivée de SCAC CDG à SDV BGF + SCAC MPL
- 2 - Récupération sous douanes par SCAC CDG du cryoconservateur auprès d'AF ou RK le lundi
- 3 - Livraison en station animale CDG pour contrôle vétérinaire
- 4 - Formalités auprès du PIF CDG par SCAC CDG
- 5 - Transbordement sous douanes avec récupération du cryoconservateur depuis la station animale pour livraison directe chez AF CDG avec documents (LTA + certificat de contrôle vétérinaire) pour embarquement sur vol AF
ATTENTION ! pas de remise à F.H. réexpédition par avion impérative.
- 6 - Préavis d'embarquement sur le premier vol possible CDG / MPL de SCAC
CDG à SCAC MPL.

E - FORMALITES D'IMPORTATION A MONTPELLIER

- 1 - Récupération des documents auprès d'AF MPL
- 2 - Paiement de la redevance vétérinaire auprès de la recette des Douanes
- 3 - Demande de "Bon à Enlever" auprès des Douanes de l'aéroport
- 4 - Livraison par SCAC MPL au CIRAD MPL
- 4 - POD de SCAC MPL à SDV BGF + ANDE BGF

F - FACTURATION

La facturation de l'ensemble des frais engagés en France et RCA est à la charge du CIRAD EMVT à Montpellier, donc les prestations de SDV BGF et SCAC CDG sont à facturer à SCAC Air Service Montpellier.